

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
 INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
 PARIS

(11) N° de publication :  
 (A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

2 443 247

785-A E

A1

DEMANDE  
 DE BREVET D'INVENTION

(21)

N° 79 00086

(54) Microbille comprenant un micro-organisme et son procédé de fabrication.

(51) Classification internationale. (Int. Cl 3) A 61 K 31/74, 9/50; B 01 J 13/02; C 12 N 1/04.

(22) Date de dépôt ..... 3 janvier 1979, à 14 h 56 mn.  
 (33) (32) (31) Priorité revendiquée : Demande de brevet déposée en Suisse le 5 décembre 1978,  
 n. 12.392/78 au nom de Société des Produits Nestlé S.A.

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. - «Listes» n. 27 du 4-7-1980.

(71) Déposant : Société dite : SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A., résidant en Suisse.

(72) Invention de : Tomaso Sozzi, Alfred Schrenk et Marcel Buhler.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Rinuy, Santarelli.

Deuxième demande divisionnaire déposée le 26 septembre 1979, n. 79.16870 AP.

La présente invention a pour objet une microbille comprenant des microorganismes, ainsi que son procédé de fabrication.

L'usage systématique des antibiotiques présente 5 des dangers certains, du fait qu'il altère la flore intestinale et qu'il favorise le développement de mutants résistant aux antibiotiques. La flore intestinale est composée à plus de 80 % de lactobacilles et de bifidobactéries. Ces dernières, dénommées anciennement Lactobacillus bifidus, 10 forment actuellement le genre distinct Bifidobacterium. Les bifidobactéries sont caractéristiques de la flore intestinale des nouveaux nés bien portants. On cherche actuellement à remplacer les antibiotiques par des cultures pures de micro-organismes capables de régénérer ou de reconstituer une flore 15 intestinale saine et vigoureuse qui empêche les germes pathogènes de se développer. Mais un microorganisme du genre Lactobacillus est en général anaérobie et un micro-organisme du genre Bifidobacterium est même strictement anaérobie, ce qui fait qu'il est difficile de les conserver 20 vivants en dehors de leur milieu naturel qui est l'intestin et qui plus est de les conserver longtemps dans des médicaments.

La présente invention répond au besoin d'un moyen de présentation, de conservation et d'utilisation par voie 25 orale de microorganismes de la flore intestinale. La présente invention fournit ce moyen sous forme d'une microbille comprenant des microorganismes

La microbille selon l'invention est caractérisée par le fait qu'elle comprend des microorganismes du genre 30 Lactobacillus et/ou Bifidobacterium et/ou d'autres genres de la flore intestinale enrobés dans une graisse solide à la température du corps.

On a découvert en effet qu'il était possible de présenter ces microorganismes sous forme de microbilles 35 de graisse solide dans lesquelles ils gardent toute leur vitalité même après une longue conservation de ces micro-

billes à température ambiante, au frigorifique à 5°C, ou au congélateur à -30°C par exemple.

On a constaté qu'il était possible d'administrer ces microbilles par voie orale et que l'essentiel de leur 5 contenu en microorganismes arrivait intact dans le tractus intestinal sans avoir été endommagé par les conditions fortement acides, pH inférieur à 2, régnant dans l'estomac. Ainsi, un microorganisme réputé fragile tel qu'un Bifidobacterium par exemple peut-il être désormais conservé 10 et administré sans problème. La présente invention représente donc un pas décisif dans la voie menant au remplacement des antibiotiques par des moyens naturels permettant de reconstituer une flore intestinale saine et vigoureuse qui s'oppose elle-même à la prolifération de microorganismes 15 pathogènes.

La présente invention comprend également un procédé de fabrication de ces microbilles, caractérisé par le fait que l'on prépare une dispersion de microorganismes du genre Lactobacillus et/ou Bifidobacterium et/ou d'autres 20 genres de la flore intestinale dans de la graisse fondue présentant un point de fusion supérieur à la température du corps, on pulvérise la dispersion dans une enceinte où règne une température inférieure au point de fusion de la graisse et l'on recueille les microbilles solidifiées.

Il est essentiel que les microorganismes ne viennent 25 pas au contact de l'air. Une graisse solide à température ambiante les tient à l'abri de l'air lors de toute manipulation précédant l'ingestion. Cette graisse devrait également rester solide lors du passage dans l'estomac, de 30 façon que les germes qu'elle contient demeurent protégés contre l'acidité qui y règne. C'est ainsi que l'on choisit de préférence une graisse comestible végétale, notamment une graisse hydrogénée de palme, d'arachide, de noix de coco, de cacao, de colza ou de soja, ou animale, dont le point de fusion 35 soit compris entre 40 et 60°C. Il n'est pas recommandé de prendre

une graisse dont le point de fusion soit supérieur à 60°C parce que la température nécessaire pour liquéfier cette graisse et préparer l'émulsion risquerait de détruire les microorganismes dont on veut précisément conserver toute 5 la viabilité.

De préférence, les microbilles comprennent de 10<sup>7</sup> à 10<sup>10</sup> individus ou germes de Lactobacillus et/ou Bifidobacterium revivifiables par gramme de graisse. Elles peuvent comprendre notamment les microorganismes Bifidobactérium (B.) animalis P23 ou B.sui Su 806, ou B. infantis Bi 1 et Bi 5 et/ou B. longum Bl 10 et Bl 11 et/ou B.breve Bbr 8 obtenus auprès de l'institut de microbiologie agricole de l'université de Bologne en Italie. Elles présentent de préférence un diamètre compris entre 0,1 et 0,5 mm. Un diamètre inférieur 15 ne présente pas de gros inconvénients si ce n'est que le rapport de la surface au volume est plus grand, ce qui signifie une perte plus grande de microorganismes pris incomplètement dans la masse. Un diamètre supérieur ne présente pas non plus d'inconvénient majeur, à l'exception du fait qu'il risque de 20 s'opposer au passage à travers des trous petits, tels que des trous de tétines de biberon par exemple. Afin d'améliorer les qualités d'écoulement d'une poudre formée d'une quantité de ces billes, ou d'éviter autant que possible la formation d'agglomérats de microbilles, on peut les enrober d'une couche 25 d'un agent antiagglomérant tel qu'une protéine par exemple. On obtient notamment de très bons résultats avec une couche extérieure de zéine ou d'un agent protecteur utilisé en galénique.

Pour mettre en oeuvre le procédé de fabrication des 30 microbilles selon la présente invention, on peut cultiver les microorganismes en milieu liquide approprié jusqu'à production d'une quantité suffisante de cellules et recueillir celles-ci par centrifugation. On peut ensuite les disperser finement telles quelles, ou après les avoir séchées par 35 cryodessiccation, dans de la graisse fondue présentant un point de fusion compris entre 40 et 60°C, à raison de 10<sup>7</sup> à 10<sup>10</sup> individus ou germes par gramme de graisse.

Pour former les microbilles, on peut pulvériser la dispersion en même temps que de l'azote liquide au sommet d'une enceinte remplie d'air stérilisé, par exemple. Mais dans une forme d'exécution préférée qui se prête d'ailleurs à la fabrication de toutes microbilles de graisse contenant un agent actif délicat craignant l'air, la chaleur et l'acide par exemple, on pulvérise la dispersion d'agent actif dans la graisse fondu au sommet d'une enceinte qui présente une zone supérieure à température modérée et une zone inférieure à basse température.

10 On a constaté en effet que l'on pouvait obtenir de la sorte des microbilles de bonne sphéricité et présentant peu de dispersion dans la grosseur.

De préférence, on pulvérise la dispersion au sommet de l'enceinte à une pression comprise entre 3 et 6 bars. A une pression inférieure à 3 bars, on obtient trop de dispersion dans la grosseur des billes. A une pression supérieure à 6 bars, on obtient des billes trop petites. La température dans la zone supérieure de l'enceinte peut être comprise entre environ  $-10^{\circ}\text{C}$  et la température de fusion de la graisse utilisée, mais on utilise de préférence une température de 15 à  $25^{\circ}\text{C}$ . Avec une température trop basse dans la partie supérieure de l'enceinte, on obtient une trop forte dispersion dans la grosseur des billes. Il s'agit donc de respecter les conditions dans lesquelles les billes se forment au mieux avant d'être saisies par le froid régnant dans la zone inférieure. La hauteur de la zone supérieure de "formation" des billes que l'on pourra se réserver au-dessus de la zone inférieure de "solidification" des billes dépendra de la hauteur totale à disposition, mais elle sera de préférence de l'ordre du mètre au moins. Le froid devant régner dans la zone inférieure de l'enceinte peut être créé en y pulvérissant de l'azote liquide. On peut pulvériser l'azote à partir du fond de l'enceinte, par exemple. La pression et le débit d'azote seront choisis en fonction de la hauteur du nuage d'azote que l'on veut obtenir.

35 Quel que soit le mode de réalisation choisi pour l'opération de la pulvérisation de la dispersion, les fines gouttelettes

formées puis solidifiées au contact d'air, d'azote ou d'autre milieu froid prévu dans l'enceinte peuvent être recueillies au bas de l'enceinte sur un transporteur ou dans un bac dont la température ne dépasse pas 5 à 15°C.

5 On peut les conditionner, les conserver et les utiliser telles quelles ou les enrober tout d'abord dans une couche de matière qui les empêche de coller les unes aux autres, autrement dit d'un agent antiagglomérant. Cet agent peut être une protéine par exemple, notamment la zéine,

10 ou un agent protecteur utilisé en galénique. On peut appliquer cette couche en pulvérisant une solution de cet agent sur les microbilles en lit fluidifié, par exemple. On peut conserver les microbilles au réfrigérateur, au congélateur ou à température ambiante.

15 Les microbilles selon la présente invention peuvent être administrées directement par voie orale, ou mélangées à certains aliments, solides ou liquides. Elles peuvent par exemple être mélangées au lait dont on remplit le biberon d'un nourrisson, leurs dimensions leur permettant de passer à travers le ou les trous de la tétine.

20

Les exemples suivants sont donnés à titre d'illustration. Les pourcentages et parties sont en poids, sauf indication contraire.

Exemple 1

25 Dans une cuve de 100 l, on prépare 80 l de milieu de culture TSAR présentant la composition suivante, en pourcents:

Extrait de levure	0,25 %
Trypticase	1,00
Phytone	0,50
30 Glucose	1,50
L-cysteine HCl	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25
ZnSO <sub>4</sub> <sup>4</sup>	0,025
FeCl <sub>3</sub> <sup>3</sup>	Trace
Eau	Balance à 100 %

On inocule avec 1 l d'une culture de 20 h de Bifidobacterium animalis P 23 obtenu auprès de l'institut de microbiologie agricole de l'université de Bologne en Italie. On incube 12 h à 37°C. On centrifuge le bouillon de 5 culture et l'on récolte 240 g de cellules. On les dilue dans 250 ml de lait écrémé additionné de 7% de lactose. On congèle le mélange à l'azote liquide. On lyophilise à 40°C pendant une nuit. On prépare une dispersion à 5% de la poudre obtenue dans de la graisse végétale hydrogénée présentant un point de 10 fusion de 42°C et liquéfiée à 45°C.

On injecte la dispersion à 45°C sous une pression de 4 bars, en même temps que de l'azote liquide, à raison de 1 partie de dispersion pour 5 parties d'azote, au sommet d'un cylindre vertical de 1,5 m de diamètre et 10 m de 15 hauteur. Au fond du cylindre est placé un récipient contenant de l'azote liquide dans lequel on recueille des microbilles dont le diamètre oscille entre 0,1 et 0,5 m.

On met un tiers des microbilles en lit fluidifié et 20 l'on pulvérise sur le lit une solution alcoolique à 8% de zéine, en quantité telle que la couche de zéine formée autour des microbilles représente 5% de leur poids.

De manière analogue, à partir d'un mélange d'Eudragit L et S (polymères anioniques de l'acide métacrylique et des esters de l'acide métacrylique) en solution à 10% dans 25 l'alcool isopropylique, on enrobe un deuxième tiers des microbilles avec une couche de mélange représentant 5 à 10% en poids des microbilles.

Après 6 mois de conservation au frigorifique à 5°C ainsi qu'à température ambiante, les trois types de microbilles 30 contiennent encore plus de  $10^8$  microorganismes vivants par gramme.

#### Exemple 2

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait qu'au fond du cylindre on recueille les microbilles sur une bande transporteuse refroidie à 5°C.

Exemple 3

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait qu'au lieu du milieu de culture TSAR, on utilise un milieu de culture présentant la composition suivante, en pourcents :

5	Extraits de levure	0,10 %
	Trypticase	0,25
	Bacto soytone	0,25
	Glucose	0,50
	L-cysteine HCl	0,001
10	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,10
	MgCl <sub>2</sub>	0,002
	ZnSO <sub>4</sub>	0,001
	FeCl <sub>3</sub>	0,0002
	Perméat de petit-lait	4,00
15	Liqueur de trempage de maïs	0,50
	Eau distillée	Balance à 100 %

Exemple 4

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on inocule le milieu avec 1 l d'une culture de Lactobacillus acidophilus au lieu de

20 Bifidobacterium animalis.

Exemple 5

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on injecte la dispersion au sommet d'un cylindre vertical de 1,5 m de diamètre et 2,5 m au lieu de 10 m de hauteur.

Exemple 6

25 On administre à sec à des rats les microbilles enrobées de zéine et conservées 6 mois de l'exemple 1, à raison de 1 g par repas et 1 repas par jour. Dès le lendemain, on dénombre des milliards de bifidobactéries dans les selles de rats auxquels on a administré les microbilles (rats traités), alors que les

selles de rats qui n'ont pas ingéré de microbilles (rats non traités) ne présentent pas de bifidobactéries. Le tableau suivant donne le résultat d'analyses comparatives des selles de rats traités et non traités :

	Avant traitement		Après 7 jours de traitement	
	Nombre de germes total (mil/g)	Dont Bifidus (%)	Nombre de germes total (mil/g)	Dont Bifidus (%)
rats non traités	5 000	0	6 500	0
rats traités	5 500	0	7 500	75

5 Un test d'hybridation du DNA des cultures de laboratoire avec le DNA des bifidobactéries isolées des selles confirme que les deux microorganismes sont les mêmes. Les bifidobactéries ont donc survécu à la conservation et au passage dans l'estomac et se sont multipliées dans le tractus digestif du rat.

#### Exemple 7

10 Afin de les administrer à des porcelets, on prépare selon la présente invention des microbilles contenant le microorganisme Bifidobacterium suis Su 806 obtenu auprès de l'institut de microbiologie agricole de l'université de Bologne.

#### Exemple 8

15 Afin de les administrer à des nourrissons lors d'essais cliniques, on prépare selon la présente invention des

microbilles comprenant les microorganismes Bifidobacterium infantis Bi 1 et Bi 5, Bifidobacterium longum Bl 10 et Bl 11, et Bifidobacterium breve Bbr 8 obtenus auprès de l'institut de microbiologie agricole de l'université de Bologne.

5 Pour ce faire, on prépare une biomasse lyophilisée des microorganismes ci-dessus. On disperse 0,25 partie de biomasse lyophilisée dans 5 parties d'huile de palme hydrogénée fondu à une température de 45°C. A l'aide d'une buse SPRAYING SYSTEM CO 5510/422, on pulvérise sous 5,5 bars 75 l/h de 10 dispersion au sommet d'une cuve de 2,7 m de hauteur à fond en entonnoir. On maintient dans la partie supérieure de la cuve une température de 26°C. On maintient dans la partie inférieure de la cuve une température de -145°C en y injectant par le bas et sous une pression de 1,6 bars, à l'aide d'une buse 15 à déflecteur, un nuage d'azote liquide dont le sommet culmine à 1,2 m au-dessous de la buse d'injection de graisse. On recueille par le fond de l'entonnoir des microbilles bien rondes dont le diamètre est compris entre 0,1 et 0,2 mm et qui renferment  $4.10^8$  germes revivifiables par g.

#### Exemples 9-12

20 On prépare des microbilles de la manière décrite à l'exemple 8, à l'exception du fait que l'on injecte la dispersion et l'azote sous différentes pressions ( $p_D$  et  $p_{N_2}$ ) et que les températures dans la partie supérieure ( $T_H$ ) et dans la partie inférieure ( $T_B$ ) de la cuve sont également 25 variées. Les conditions de divers essais et les résultats, tels qu'observés au microscope, sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Exemple No	$P_D$ (bars)	$P_{N_2}$ (bars)	$T_H$ (°C)	$T_B$ (°C)	Résultats (vus au microscope)
9	3,5	1,3	-9,5	-110	Billes de diamètre (Ø) 0,2 à 0,5 mm. Peu de dispersion. Bonne sphéricité
10	10	1,3	-22,3	-94,2	Billes de Ø inférieur à 0,1 mm. Trop de billes minuscules. Bâtonnets en quantité.
11	4	1,6	21	-150	Billes sphériques de Ø 0,3 à 0,5 mm. Peu de dispersion
12	10	1,6	19,6	-143	Billes sphériques mais de Ø inférieur à 0,1 mm.

REVENDICATIONS

1. - Microbille comprenant un microorganisme, caractérisée par le fait qu'elle comprend des microorganismes du genre Lactobacillus et/ou Bifidobacterium et/ou d'autres genres de la flore intestinale enrobés dans une graisse solide à la température du corps.

5 2. - Microbille selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle comprend, par gramme de graisse, de  $10^7$  à  $10^{10}$  individus ou germes de Lactobacillus et/ou Bifidobacterium reviviables des souches Bifidobacterium (B.) animalis P 23 ou B.sui Su 806, ou B.infantis Bi 1 et Bi 5 et/ou B.longum Bl 10 et Bl 11 et/ou B.breve Bbr 8 obtenus auprès de l'institut de microbiologie agricole de l'université de Bologne en Italie.

10 3. - Microbille selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle présente un diamètre compris entre 0,1 et 0,5 mm.

15 4. - Microbille selon la revendication 1, caractérisée par le fait que la graisse présente un point de fusion compris entre 40 et 60°C, cette graisse étant en particulier une graisse animale ou végétale, notamment une graisse hydrogénée de palme, d'arachide, de noix de coco, de cacao, de colza ou de soya.

20 5. - Procédé de fabrication de microbilles selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on prépare une dispersion de microorganismes du genre Lactobacillus et/ou Bifidobacterium et/ou d'autres genres de la flore intestinale dans de la graisse fondue présentant un point de fusion supérieur à la température du corps, on pulvérise la dispersion dans une enceinte où règne une température inférieure au point de fusion de la graisse et l'on recueille les microbilles solidifiées.

25 6. - Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'on prépare une dispersion de  $10^7$  à  $10^{10}$  individus ou germes par gramme de graisse de Lactobacillus et/ou de Bifidobacterium des souches Bifidobacterium animalis P 23 ou B.sui Su 806, ou B.infantis Bi 1 et Bi 5 et/ou B.longum Bl 10 et Bl 11 et/ou B.breve Bbr 8 obtenus auprès de l'institut de microbiologie agricole de l'université de Bologne en Italie.

7. - Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'on utilise une graisse dont le point de fusion est compris entre 40 et 60°C.

5 8. - Médicament, utile en particulier pour la restauration de la flore intestinale, caractérisé en ce qu'il contient une microbille selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

